

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RECHERCHE DES EFFETS DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES
BACTÉRIES LACTIQUES SUR LE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RÉSISTANT
À LA MÉTHICILLINE (SARM)

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

MARI BAZO

MAI 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Le présent mémoire fut rédigé par Mari Bazo. Il présente les résultats d'un projet de recherche réalisé grâce au financement de la compagnie BioK Plus. Le projet a été effectué sous la direction du Dr Wanda Smoragiewicz.

J'aimerais remercier avant tout ma directrice de recherche, Dr Wanda Smoragiewicz de l'UQAM, et ma co-directrice, Dr Barbara Karska-Wysocki de l'Université de Montréal, département de biochimie pour leur accueil, leur support, et leurs conseils pendant ma maîtrise.

J'aimerais remercier aussi ma famille, premièrement l'esprit de mon père Dr George Bazo qui est resté toujours avec moi ; ma mère madame Lina Bazo pour son aide et sa patience pendant mes études ; mon grand frère Dr Pierre Bazo qui m'a donné toujours les conseils et les nouvelles idées pour le développement de mon projet ; ma sœur Lucie Bazo et son mari, Dr Nicolas Bochi ; leurs enfants Mikeal et Nicole pour leur support et leur courage ; mon petit frère Michel Bazo qui m'a donné l'esprit de l'enthousiasme et le support.

Et finalement j'aimerais remercier mes collègues de laboratoire, Alexandre Prince, John Schellenberg et François Daigle pour le temps que nous avons passé ensemble et pour leur esprit d'équipe.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ.....	x
PRÉSENTATION PAR AFFICHES ET PUBLICATIONS.....	xi
INTRODUCTION.....	1
1. Problématique.....	1
2. Résistance aux antibiotiques.....	2
3. Production des toxines par le genre de <i>S. aureus</i>	2
4. Microflore normale des animaux et de l'être humain.....	3
5. Effet de l'activité antibactérienne des probiotiques.....	3
6. Mécanismes d'adhésion des bactéries lactiques chez l'humain.....	4
7. Description des bactéries lactiques à l'étude.....	5
8. Identification des bactéries lactiques.....	6
8.1. Identification des bactéries lactiques au niveau phénotypique.....	7
8.1.1 La fermentation des sucres.....	7
8.1.2 La production des exopolysaccharides (EPS).....	7
OBJECTIF DE L'ÉTUDE.....	9
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	10
1. Description des souches de bactéries lactiques et leurs milieux de cultures.....	10
1.1 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques chez les souches de LAB.....	10
1.2 Fermentation des sucres par LAB venant de la collection européenne.....	11
1.3 Recherche de la présence de l'ADN plasmidique chez les souches de LAB.....	11
2. Les bactéries de SARM.....	12
2.1 Caractérisation et vérification de la présence de gène <i>mecA</i> chez l'isolat de SARM.....	13
3. Recherche de l'activité antibactérienne en milieu solide gélosé.....	13

RÉSULTATS.....	15
1. La présence du gène de <i>mecA</i> et du gène production de coagulase <i>coa</i> chez l'isolat clinique du SARM	15
2. Vérification de présence de l'ADN plasmidique chez le souche de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL 1285 et <i>Lactobacillus casei</i> (souche isolés par BioK Plus).....	17
3. Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 et de <i>Lactobacillus casei</i>	19
4. Détection de l'activité antibactérienne des produits commercialisés par la compagnie BioK Plus à base de lait ou de soya envers le SARM 43.....	21
5. Comparaison de l'activité antibactérienne de <i>L. acidophilus</i> CL1285 et de <i>L. casei</i> envers le SARM 43.....	22
6. Recherche des meilleures conditions pour la préparation de mélange de <i>L.casei</i> et <i>L.acidophilus</i>	23
7. Mesure de la sensibilité de 10 souches de SARM individuelles en présence de <i>L.acidophilus</i> et de <i>L.casei</i>	24
8. Détection de l'activité antibactérienne chez le <i>L. acidophilus</i> CL1285 et le <i>L.casei</i> envers le mélange de dix souches de SARM.....	25
9. Recherche en milieu liquide de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques de Biok Plus envers le SARM 43.....	26
10. Activité antibactérienne des bactéries lactiques d'origine européenne contre le SARM.....	30
10.1 Identification des bactéries lactiques par la fermentation des sucres en se basant sur le test de API CHL 50 Medium.....	30
10.2 Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques de <i>L. acidophilus</i> , <i>L. salivarius</i> et <i>L.delbruckii</i>	31
10.3 Comparaison d'activité anti-SARM chez les souches européennes séparées et mélangées.....	31

DISCUSSION.....	34
CONCLUSION.....	37
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	38

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : L'amplification de région <i>mec A</i> et <i>coa</i> de 11 échantillons d'ADN isolés de souches de SARM	16
Figure 2 : Électrophorèse sur le gel d'agarose 0.8 % de l'ADN plasmidique de la souche de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL 1285 et <i>Lactobacillus casei</i>	17
Figure 3 : Test d'antibiogramme en présence de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 et <i>lactobacillus casei</i> avec l'oxacilline et la méthicilline.....	19
Figure 4 : Zone d'inhibition de la croissance de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> ATCC 11454 en présence de 5 µg de méthicilline.....	20
Figure 5 : Zones d'inhibition de la croissance du SARM 43 isolat clinique par les bactéries lactiques.....	22
Figure 6 : Test antibiogramme en présence de <i>Lactobacillus acidophilus</i> 8/4 <i>Lactobacillus salivarius</i> AWH, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> avec 5ug de la méthicilline.....	31
Figure 7 : Zones d'inhibition de la croissance de SARM 43 clinique en présence de <i>Lactobacillus acidophilus</i> 8/4, <i>lactobacillus salivarius</i> AWH, <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	32

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractérisation des souches LAB basée sur le critère de fermentation des sucres.....	8
Tableau 2 : Description des isolats cliniques du SARM.....	12
Tableau 3 : Diamètres de zones d'inhibitions de SARM 43 par les produits BioK Plus à base de lait et de soya.....	21
Tableau 4 : Rapport quantitatif de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 et de <i>Lactobacillus casei</i> dans les cultures mixtes et la mesure des zones d'inhibition de la croissance de SARM 43 par <i>Lactobacillus</i>	23
Tableau 5 : Mesures des diamètres des zones d'inhibition (cm), de la croissance de 10 souches cliniques de SARM séparément en présence de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL 1285 et de <i>Lactobacillus casei</i>	24
Tableau 6 : Zones d'inhibition de la croissance de dix souches de SARM mélangées en présence de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 et de <i>Lactobacillus casei</i>	26
Tableau 7 : Nombre de bactéries viables (CFU/ml) dans les monocultures.....	27
Tableau 8 : Nombre de cellules CFU x 10 ⁵ dans 100µl et 500µl avant incubation.....	28
Tableau 9 : Nombre de bactéries viables dans les cultures mixtes.....	29
Tableau 10 : Résultats de test API CHL 50 Medium en présence de Mannitol et Cellobiose.....	30
Tableau 11 : Zones d'inhibition (cm), de la croissance de la souche clinique SARM 43 en présence de <i>Lactobacillus acidophilus</i> 8/4, de <i>Lactobacillus salivarius</i> AWH, <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	33

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

CFU	Colony-forming units
TCU	Total cell-units
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
LAB	Lactic acid bacteria
ATCC	American Type Culture Collection
PM	Peptonized Milk
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
BHI	Brain Heart Infusion
MIC	Minimal Inhibition Concentration
MSA	Mannitol Salt Agar

RÉSUMÉ

Il existe présentement un grand besoin, dans les milieux médicaux et hospitaliers, de trouver une solution efficace pour combattre les infections causées par *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Le but de cette étude est d'évaluer *in vitro* le potentiel inhibiteur des souches de bactéries lactiques (LAB) venant de l'entreprise canadienne (BioK Plus) et ceux venant de l'Europe (Pologne). Ceci permettra de réduire la prolifération des bactéries pathogènes SARM dans une culture mixte. Nous avons caractérisé les souches des bactéries lactiques (LAB) par le critère de fermentation des sucres selon le test API 50 CHL Medium. Ensuite nous avons démontré l'éradication de SARM dans la culture mixte avec les bactéries lactiques sur le milieu sélectif et sur le milieu liquide. La capacité inhibitrice des LAB a été testée par la méthode de diffusion sur la gélose et en milieu liquide. Les souches européennes et les souches de BIOK+ démontrent une activité antibactérienne *in vitro* envers la souche de SARM. Le dénombrement des colonies a démontré la diminution des cellules de SARM dans une culture mixte qui contenait le *Lactobacillus acidophilus* et le *Lactobacillus casei*. De plus, les caractérisations de nos souches ont démontré que les souches européennes sont sensibles aux antibiotiques (méthicilline, oxacilline) tandis que les souches de BioK Plus sont résistantes aux mêmes antibiotiques. Cette étude a démontré le potentiel inhibiteur des LAB envers les souches pathogènes. L'effet antagoniste entre les LAB et le SARM pourra être appliqué pour réduire la présence des bactéries multirésistantes aux antibiotiques dans l'environnement.

Les conférences avec la présentation d'affiches

L'effet de l'activité antibactérienne de bactéries lactiques sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), L'ACFAS, Trois-Rivières, Mai 2007. Bazo,M., Smoragiewicz,W., Karska-Wysocki,B.

Use of lactic acid bacteria to eradication of nosocomial multidrug resistant pathogen methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 13th World Congress

Clinical Nutrition, Mexico, Janvier 2008. Smoragiewicz,W.,Bazo,M., Schellenberg ,J., Karska-Wysocki ,B.

Publications

Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Journal of Microbiological Research, volume 165, issue 7, January 2010, Karska-Wysocki,B., Bazo,M.,Smoragiewicz.W.,

Growth inhibition and elimination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by lactic acid bacterial strains, Patent Application accepted in USA, Pub No 60/876, 460, 2008

Smoragiewicz,W.,Karska-Wysocki ,B., Bazo,M., Ruiz,M.,Luquet,FM.

INTRODUCTION

L'émergence de souches de *Staphylococcus aureus* multirésistantes aux antibiotiques représente un problème majeur dans les milieux hospitaliers (Anderson et al., 2008).

Il existe présentement un grand besoin de trouver une solution efficace pour combattre la bactérie *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (SARM), et jusqu'à maintenant cette bactérie reste sensible seulement à la vancomycine (Libert et al., 2008).

Dernièrement, d'importants efforts ont été déployés pour développer l'usage des probiotiques comme agents bio thérapeutiques, les bactéries lactiques (LAB) possèdent une capacité inhibitrice contre des bactéries pathogènes, telles que la *Salmonella* et le *Staphylococcus aureus*.

Cette capacité a été trouvée par nous et l'autres chercheurs (Massi et al.,2004, Nomato 2005), notamment dans notre laboratoire, Karska et al.,2010, Smoragiewicz et al 2008, Schellenberg et al .,2006 et Daigle .,2003. Les probiotiques peuvent donc être utiles pour résoudre des problèmes reliés aux infections de SARM.

1. La problématique:

L'inquiétante montée des maladies nosocomiales à été largement médiatisée au cours des dernières années. Les problèmes de contamination de la population humaine par les bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques obligent les scientifiques à intensifier la recherche dans ce domaine (Simor et al.,2001, Anderson et al.,2008, Libert et al 2008).

La bactérie *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (SARM) présente souvent un caractère pathogène dangereux et peut être la cause d'infections cutanées, car elle constitue présentement la flore naturelle humaine. (Roghmann and McGrail,2006, Simor et al.,2001).

C'est en 1960, en Europe, que le SARM fut observé une première fois. Depuis, sa propagation a été rapide partout dans le monde. Au début de 1980, le pourcentage de cas de SARM par rapport à la totalité des cas de *Staphylococcus aureus* était inférieur à 3%. Dix ans plus tard, le SARM représentait un problème considérable dans les hôpitaux des États-Unis et d'Europe (Mylotte, 1996). Aux États-Unis, le SARM est responsable de 25% des infections nosocomiales (Voss et al., 1994).

Au Canada, la première observation de SARM eut lieu en 1980 (Annear, 1984). Les infections causées par cette bactérie sont malheureusement très difficiles à traiter en raison de la résistance qu'elle oppose d'autres antibiotiques et de la production des protéines extracellulaires qui agissent comme des facteurs de toxines (Novick., 2001).

2. La résistance aux antibiotiques

L'existence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques constitue un problème considérable. Le SARM présente ce caractère très résistant à la plupart des antibiotiques.

Plus des 90% du *Staphylococcus aureus* présentent une résistance à la pénicilline, nafcillin, oxacilline et méthicilline (Novick., 2001). Les bases moléculaires de la résistance aux antibiotiques sont déterminées par le gène *mecA* (Novick P. R 2001). Ce gène est responsable de la production d'une protéine, la *Penicillin binding protein* (PBP). Or, dans le cas du SARM, ce gène a été modifié pour produire une protéine (PBP-2A) ayant une faible affinité pour la liaison avec les antibiotiques beta-Lactames (Kuroda et al, 2001).

3. La production des toxines par le genre de *S.aureus*.

Le *Staphylococcus aureus* est responsable de la production de nombreuses toxines et enzymes qui menacent la sante humaine, telles que la hyaluronidase ; elle permet aux Staphylocoques de dissoudre un des constituants de la substance fondamentale du tissu

conjonctif et ainsi de se propager dans le derme. La coagulase provoque la formation de fibrine et empêche ainsi l'arrivée de différents produits antimicrobiens. Les hémolysines détruisent les érythrocytes. Les entérotoxines sont responsables de la présence des toxines dans les aliments (entérotoxines A, B, C1, C2, C3, D et E), TSST -1 (toxic shock syndrome toxin 1) ; elles sont proches de la composition des entérotoxines B et C, elles sont également retrouvées dans 20 % des souches de *Saphylococcus aureus* (Regnault, 2002).

4. La microflore normale des animaux et de l'être humain

Il existe chez tous les animaux et chez l'être humain une microflore normale contenant de nombreuses bactéries; parmi ces bactéries on peut identifier aussi le SARM. Cette microflore se trouve sur la peau, sur la surface externe des animaux et des être humains, dans les systèmes digestif et respiratoire, vaginal et sur la peau (Wilson, 2008). L'état d'équilibre de cette microflore est une condition très importante pour la santé des hommes et des animaux, car elle permet de se protéger contre les bactéries pathogènes. Les organismes pathogènes peuvent facilement se développer chez les êtres vivants, soit par transmission de la mère, soit par contact direct avec l'environnement (Chambers, 2001). L'usage d'antibiotiques joue un rôle crucial dans la lutte pour éliminer les bactéries pathogènes comme la *Salmonella*, le *Campylobacter*, le *Staphylococcus*, et *Clostridium difficile* (Millette et al., 2007). Dans le cadre de cette étude, on a appliqué une nouvelle approche dans l'utilisation des probiotiques pour résoudre le problème de contamination de l'environnement par le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (Karska et al., 2010, Smoragiewicz et al., 2008).

5. L'effet de l'activité antibactérienne des probiotiques

Les études de Makras et al. (2006), ont déjà confirmé l'activité antagoniste des LAB contre les bactéries pathogènes comme la *Salmonella*, le *Staphylococcus aureus* et le *E. coli*. Les propriétés antibactériennes des LAB dépendent de plusieurs critères : le pH, le milieu de

croissance et la production de substances antibactériennes comme les bactériocines, les acides organiques, les acides gras et le peroxyde d'hydrogène (Huttunen et al., 1995). La fermentation des glucides est un procédé très important pour les LAB. L'acidification du milieu par l'acide lactique joue un rôle considérable dans la capacité inhibitrice des LAB contre plusieurs bactéries pathogènes. Hicks et Goepfert (1968) ont bien confirmé que l'acide lactique et l'acide acétique produits par les bactéries lactiques participent à l'inhibition de *Staphylococcus aureus*. Ils ont démontré aussi que la *Salmonella* pouvait être inhibée par le pH inférieur à 4.4 pour l'acide lactique et à 5.4 pour l'acide acétique (Huttunen et al., 1995).

Reid et al., (2003), ont clairement démontré l'application des LAB dans la maintenance de la santé humaine, ainsi que dans la stimulation du système immunitaire. Les bactéries lactiques possèdent aussi des propriétés antitumorales contre le cancer du colon. De plus, elles sont capables de diminuer le taux de cholestérol sanguin et elles présentent un effet antidiabétique. (Martha et al., 2001, Rafter, 2003).

6. Les mécanismes d'adhésion des bactéries lactiques chez l'humain

Le système digestif chez l'humain en santé pourrait contenir plus de 200 espèces bactériennes différentes. Le rôle biologique de ces bactéries est important pour la régulation de la transition intestinale, la protection contre les bactéries pathogènes qui se trouvent dans l'intestin, la stimulation du système immunitaire et la production des vitamines. Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité d'adhésion aux cellules épithéliales de l'homme : cette adhésion apparaît chez les *Lactobacilles acidophilus* et les Bifidobactéries. Ces souches sont connues pour leur forte capacité d'adhésion à la surface de l'intestin, ceci peut les aider à résister aux conditions défavorables de l'intestin. De l'autre côté, les bactéries lactiques peuvent empêcher l'adhésion de plusieurs bactéries pathogènes par la sécrétion d'inhibiteurs d'adhérence. Cette capacité se retrouve chez plusieurs bactéries lactiques telles que les *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus* et Bifidobactéries. (Matto et al., 2006).

7. Description des bactéries lactiques à l'étude

Lactobacillus

Le genre *Lactobacillus*, qui contient près de 80 espèces, représente la plus grande famille de bactéries lactiques. Il s'agit d'une bactérie gram-positif, en forme de bâtonnet, non sporulant et parfois de coccobacilles dépourvus de catalase et de cytochrome. Elles sont généralement anaérobies facultatives et leur produit de fermentation des sucres est l'acide lactique. Les *Lactobacillus* se développent quand le pH se situe entre 4.5 et 6.4, on trouve ce type de pH à la surface des plantes, dans les produits laitiers, la viande, l'eau, la bière, les fruits. Les *Lactobacillus* font aussi partie de la flore normale du corps humain et ils se retrouvent dans la bouche, la peau, le tractus intestinal et le vagin (Wilson et al., 2008).

Lactobacillus acidophilus 8/4

C'est une bactérie anaérobie facultative, bacilles avec extrémités rondes, qui fermente plusieurs sucres tels que le Lactose, le Sucrose, le Mannose, le Maltose et le Cellobiose. La température de la croissance varie entre 35 et 38 °C (Wilson et al., 2008).

Lactobacillus salivarius AWH

C'est une bactérie anaérobie facultative, bacilles avec extrémités rondes, qui fermente le Galactose, le Lactose, le Sucrose, le Mannitol, le Maltose. La température optimale de la croissance varie entre 30 et 40 °C (Wilson et al., 2008).

Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus 151

C'est une bactérie anaérobie facultative, bacilles avec extrémités rondes. Elle fermente seulement le Lactose, le Galactose, le Glucose., la température de la croissance varie entre 40 et 43 °C (Wilson et al., 2008).

Lactobacillus casei LBC80R

C'est une bactérie anaérobie facultative, bacilles gram positif. Elle fermente le glucose, le lactose, la température de croissance est de 37°C (Luquet, 2003).

Lactobacillus acidophilus CL1285

C'est une bactérie anaérobie facultative, bacilles gram positive. Elle fermente le glucose, la température de croissance est de 37°C (Luquet, 2003).

Lactococcus

C'est un genre de bactéries à gram positif, en forme de coques, non sporulantes. La température optimale de la croissance est de 30°C ; il existe cependant des espèces qui peuvent croître à 10 °C, mais pas à 45°C (Wilson et al., 2008).

Lactococcus lactis ssp lactis ATCC 11454

C'est une souche anaérobie facultative, en forme de coques sphériques, qui fermente le Lactose, le Glucose, le Maltose et le Fructose. Cette souche est connue pour sa production de nisine (substance antimicrobienne) (Lee et al ., 1999).

8. Identification des bactéries lactiques

Généralement, il existe plusieurs critères pour identifier les bactéries lactiques au niveau phénotypique : la forme des cellules bactériennes, la température de la croissance, la fermentation des sucres, les activités physiologiques et biochimiques, la production des exopolysaccharides (Wood et Holzapfel, 1995).

8.1 Identification des bactéries lactiques au niveau phénotypique

8.1.1 La fermentation des sucres

Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité de fermentation des glucides. Chaque souche fermente des sucres différents. En nous basant sur ce critère d'identification nous pouvons sélectionner les bactéries lactiques, tableau 1 (Wood et Holzapfel, 1995).

8.1.2 La production des exopolysaccharides (EPS)

Les EPS sont connues pour leur action bénéfique aux bactéries lactiques. Elles les protègent contre la phagocytose et les bactériophages, les toxines et les bactériocines (De Vuyst et al, 1999). Il existe une relation entre la production des EPS par les bactéries lactiques et la sensibilité ou la résistance contre la nisine (peptide antimicrobien produit par le *Lactococcus lactis*).

Tableau 1 : Caractérisation des souches LAB basée sur le critère de fermentation des sucres

Fermentation des glucides	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus Delbrueckii ssp bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
Amygdaline	+	-	-	-	-
Cellobiose	+	-	-	-	-
Galactose	+	+	-	-	+
Lactose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	-	+
Mannitole	-	+	-	-	-
Mannose	+	-	-	ND	-
Melibiose	-	+	-	-	-
Sucrose	+	+	-	ND	+

Légende

+ 90% ou plus des souches sont positives pour la fermentation des sucres

- 90% ou plus des souches sont négatives pour la fermentation pour des sucres

ND Les résultats ne sont pas disponibles

(Wood et Holzapfel, 1995).

OBJECTIF DE L'ÉTUDE

L'objectif principal de la recherche présentée dans ce mémoire de maîtrise a été de trouver les souches de LAB qui sont capables de démontrer l'activité antibactérienne envers le SARM.

Les souches de SARM utilisées dans cette étude provenaient de différents patients infectés par le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. Les souches de LAB ayant l'activité antibactérienne proviennent de 2 sources. Une source canadienne a été l'industrie laitière (BioK Plus international Inc.). Ces souches ont été brevetées en 2003 (N 6607905). La deuxième source provient de la collection de Dr Bielecka (Département de microbiologie alimentaire Académie des Sciences Polonaises, Olsztyn, Pologne).

Matériels et méthodes

1. Description des souches de bactéries lactiques et leurs milieux de cultures

Durant nos études sur l'activité anti SARM de bactéries lactiques, deux types de collections de LAB ont été utilisés. La collection de Dr Bielecka comprenait les souches de *Lactobacillus (Lb) acidophilus* 8/4, *Lb salivarius* AWH, et *Lb delbreckei*.

La collection suivante venait de l'entreprise laitière BioK Plus international Inc., contenant la souche *Lactobacillus acidophilus* CL 1285 et *Lactobacillus casei*.

Durant nos expériences nous avons appliqué comme souches contrôles 2 souches de LAB, *Lactococcus lactis* spp 11454 ATCC, et *Lactococcus lactis* spp *cremoris*.

Les milieux de croissance pour toutes les souches de *lactobacillies* ont été MRS (Difco) agar ou bouillon et le milieu lait peptonisé (sigma).

L'incubation des milieux gélosés et inoculés par les *lactobacillies* a été maintenue à 37°C pendant 24h en condition anaérobie en présence de système de gaz pak plus (BBL). Pour cultiver les souches de *Lactococcus*, le milieu M 17(Difco) a été appliqué. Ce milieu a été enrichi avec lactose (0.2 %) et glucose (0.1 %).

Toutes les souches de LAB ont été conservées en présence de 12 % de glycérol sur les milieux liquides MRS ou M 17, et congelées à -20°C.

1.1 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques chez les souches de LAB

Les souches de LAB venant des 2 collections que nous avons étudiées nous ont permis de déterminer leur sensibilité à la méthiciline et à l'oxacilline à l'aide du milieu Muller Hinton gélosé.

Les antibiotiques proviennent de la compagnie Oxoid, oxacilline 1 µg et méthicilline 5 µg.

Sur ce milieu gélosé et inoculé par LAB, nous avons déposé les disques contenant 3 µg de méthiciline et 1 µg d'oxacilline (Oxoid). Les boîtes de pétri ont été incubées pendant 24h à 37°C. À part le test d'antibiogramme sur gélose, nous avons aussi vérifié la sensibilité à l'antibiotique l'oxacilline (6µg/ml) des souches de *L. acidophilus* cl 1285 et *L. casei* sur le milieu liquide de Muller Hinton (IDSR 2006).

1.2 Fermentation de sucres par LAB venant de la collection européenne

Pour pouvoir établir les conditions optimales de la croissance et de la fermentation des sucres chez les souches de la collection de Dr Bielecka, nous avons appliqué le system API CHL 50 Medium, en nous basant sur les instructions du producteur (Murray et al., 1995).

Pour effectuer ce test, nous avons inoculé la culture fraîche des bactéries lactiques sur MRS Broth. Cette culture a été diluée 100 fois et incubée à 37°C pendant 24 heures en condition anaérobie (premier passage sur le milieu liquide). Le deuxième passage a été effectué par prélèvement de 200 µl de culture bactérienne sur le milieu API contenant le sucre Mannitol et Cellobiose, et incubation à 37°C pendant 24 heures.

1.3 Recherche de la présence de l'ADN plasmidique chez les souches de LAB

À l'aide de KIT Roche (High Pure Plasmid Isolation Kit), nous avons procédé à la recherche de l'ADN plasmidique chez les souches de *L. casei* et *L. acidophilus* CL 1285. Les échantillons obtenus ont été déposés sur le gel 0.8 %. L'électrophorèse a été poursuivie en présence de bromethilium pendant 17 h et l'analyse de gel a été faite à l'aide de Bio Rad système Quantitiy one FX. La mesure quantitative de l'ADN a été effectuée à l'aide de QUBIT Quantification Système suivant la procédure d'Invitrogen.

2. Les bactéries SARM

Les souches de SARM (les isolats cliniques humains) et les souches standard telles que 43300 ATCC proviennent du laboratoire de Dr Barbara Karska-Wysocki de l'Université de Montréal.

Tableau 2 : Description des isolats cliniques du SARM

Numéro de souche de SARM	Source d'infections
18	du nez
22	d'une plaie de mollet
27	d'une plaie de cuisse
36	de pus abdominal
43	de poumons
61	du vagin
64	des yeux
69	du nez
75	de la langue
80	de pus d'une plaie

Ces souches sont sensibles à la vancomycine, tandis qu'elles sont résistantes à la méthicilline, à l'oxacilline, à l'érythromycine et à la céfazoline (Yazdanparsat, 2002).

Sur les milieux employés pour cultiver les souches de *S.aureus*, (en bouillon ou en gélose) on a appliqué BHI (Difco) et PM (Sigma). Comme milieu sélectif pour *S.aureus* on a utilisé Manitol Salt Agar (Difco). Sur ce milieu, les bactéries lactiques que nous avons utilisées ne peuvent pas se développer.

Pour la préservation des souches de SARM, nous les avons cultivées sur BHI et ensuite sur la gélose de sang (5 % de sang de mouton). Par la suite elles ont été suspendues en BHI contenant 12 % de glycérol et congelées à -20 °C.

2.1 Caractérisation et vérification de la présence de gène *mecA* chez l'isolat de SARM

Nous avons recherché la présence du gène *mecA* et du gène de production de coagulase (*coa*) chez les souches de SARM portant les numéros suivants : 18, 22, 27, 36, 43, 61, 64, 69, 75 et 80.

À partir des cultures de 24 heures incubées à 35°C en présence d'oxacilline, nous avons procédé à l'isolement d'ADN génomique en appliquant le kit Roche (*High Pure PCR template preparation Kit*).

Pour reconfirmer la présence chez ces souches de gènes *mecA* et *coagulase*, nous avons appliqué les échantillons d'ADN génomique dans la réaction PCR suivant le protocole de Kit Novacastra qui contient deux paires d'oligonucléotides (amorces). Ceci a permis d'amplifier la région de gène *mecA* (214 bp) et la région de gène *coa* (117 bp).

Après l'amplification, les échantillons ont été déposés sur le gel d'agarose 1.5% en présence d'un marqueur de poids moléculaire(DNA-Ladder-Sigma).

La lecture de gel a été faite après électrophorèse pendant 105 min à 90 Volt, en présence de brométhilum. La migration d'ADN a été observée en UV dans le système de BioRad, « Quantity One ». La résistance à l'antibiotique de dix souches de SARM analysées a été aussi vérifiée en milieu liquide de Mueller-Hinton, en déterminant la dose minimale d'oxacilline (MIC égal à 8µg/ml) (Yazdanparast ,2002).

3. Recherche de l'activité antibactérienne en milieu solide gélosé

L'inhibition de la croissance du SARM par les bactéries lactiques a été testée par la méthode modifiée de diffusion sur gélose par Jacobsen et ses collaborateurs (1999) et Schellenberg et ses collaborateurs (2006).

On a appliqué le même test aux 10 souches de SARM qui ont été précédemment mélangées. Nous avons préparé des pré-cultures bactériennes de *L. acidophilus* et *L. casei* sur le milieu de lait PM (Sigma), et des pré-cultures bactériennes de dix souches de SARM (18, 22, 27, 36, 43, 61, 64, 69, 75, 80) sur le même milieu. Toutes ces souches ont été incubées pendant 24h

à 37°C. Par la suite, on a déposé 3 µl de chaque culture bactérienne de *L. acidophilus* et *L. casei* sur la gélose (1,2%) qui contient 7 ml de MRS. On a incubé les boîtes qui contenaient les bactéries lactiques pendant 24h à 37°C dans les conditions d'anaérobies (Gaz Pak system). À partir de la culture de SARM de 24 h sur le milieu de BHI, on a transféré 200 µl dans les tubes contenant 7 ml de BHI (0.7 %) de gélose. Ceci a été coulé sur la surface de pétris qui contenaient la croissance de bactéries lactiques. Les boîtes ont été incubées pendant 24h à 37°C et on a mesuré les zones d'inhibition de la croissance de SARM.

RÉSULTAT

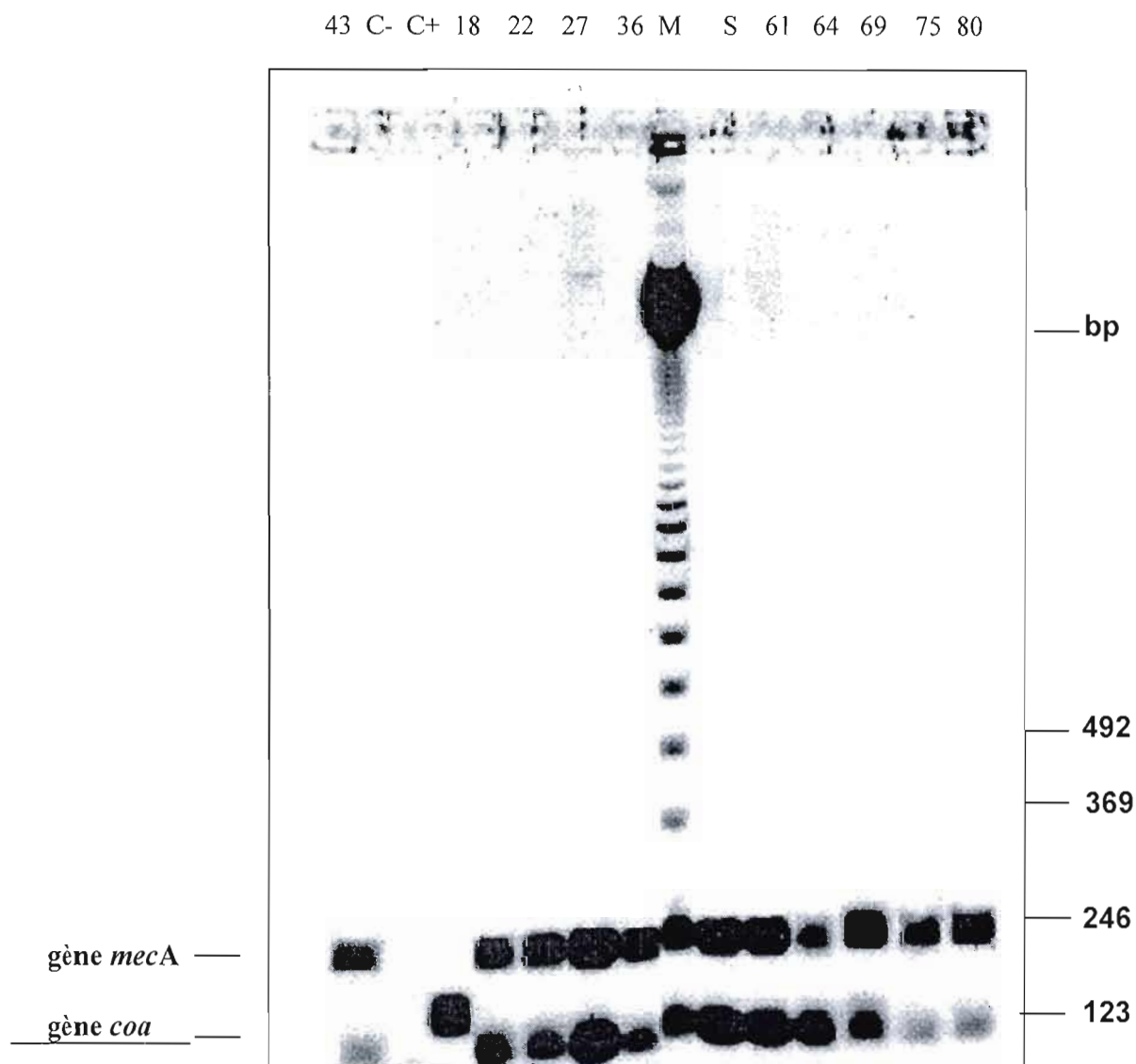
1. Présence du gène de *mecA* et du gène production de coagulase *coa* chez l'isolat clinique du SARM

Le but de cette expérience a été la confirmation de la présence de 2 gènes (*mecA* et *coa*) dans chaque isolat de SARM que nous avons utilisé dans ce projet de recherche.

Ce sont les souches cliniques humaines prélevées de différents patients infectés par le SARM. (Tableau 2).

La figure 1 démontre le gel d'électrophorèse et la migration de 11 échantillons d'ADN amplifiés par la réaction de PCR. L'ADN provenait de souches de SARM.

Figure 1 : L'amplification de région *mec A* et *coa* de 11 échantillons d'ADN isolés de souches de SARM.



C+ : contrôle positif de la réaction de PCR

C - : contrôle négatif (absence d'amplification)

M : marqueur du poids moléculaire d'ADN (Ladder 123)

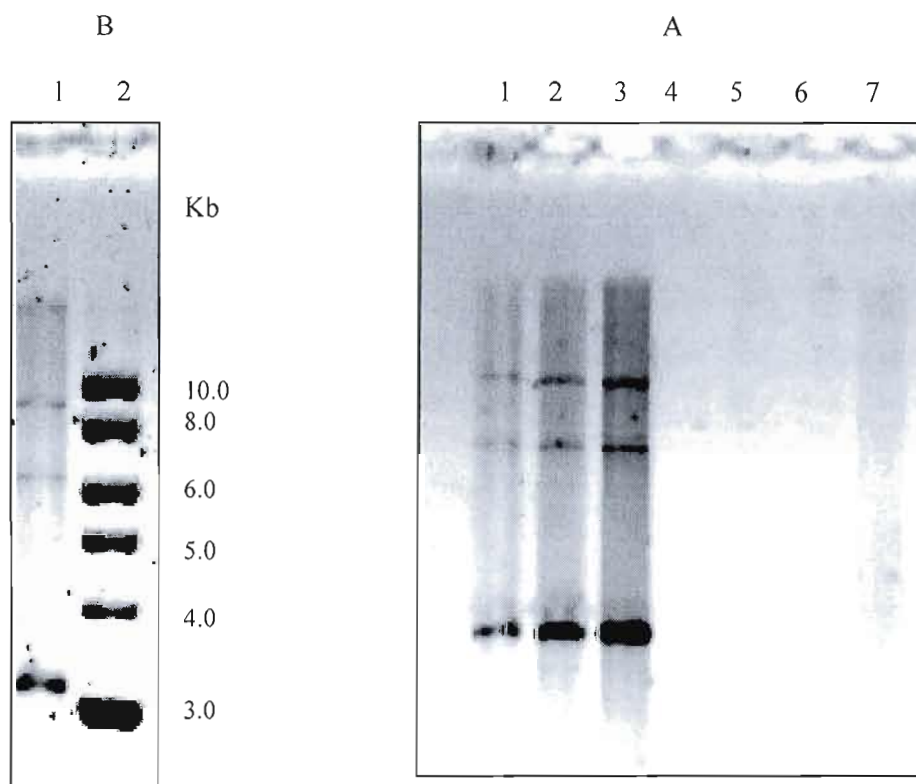
S : souche standard résistante à la méthicilline (ATCC 43300)

Nos résultats confirment que toutes les souches de SARM qui étaient testées possèdent le gène *mecA* et le gène de la production de coagulase *coa*.

2. Vérification de présence de l'ADN plasmidique chez le souche de *Lactobacillus acidophilus* CL 1285 et *Lactobacillus casei* (souche isolés par BioK Plus).

L'extraction de l'ADN plasmidique de *Lactobacillus acidophilus* CL 1285 et de *Lactobacillus casei* a été effectuée avec le Kit QIAGEN selon la procédure fournie par la compagnie. L'électrophorèse a été effectuée pendant 16-17 heures en 40 Volts. La lecture des résultats a été faite à l'aide du système BioRad, Quantity One FX.

Figure 2 : Électrophorèse sur le gel d'agarose 0.8 % de l'ADN plasmidique de la souche de *Lactobacillus acidophilus* CL 1285 et *Lactobacillus casei*



La partie A montre la migration d'ADN plasmidique isolé à partir de 2 souches de *CL1285* et *L. casei*. Les échantillons ont été déposés sur le gel contenant les 3 volumes suivants : *Lactobacillus acidophilus* CL 1285 (puits 1- 5µl, 2-10 µl, 3- 15 µl) et *Lactobacillus casei* (puits 5- 5µl, 6- 10 µl, 7-15 µl).

La partie B montre :

puits 1 - l'échantillon de l'ADN plasmidique de *Lactobacillus acidophilus* CL 1285

puits 2 - le marqueur de poids moléculaire (2 log DNA Ladder, Biolab).

Selon les résultats que nous avons obtenus, nous constatons la présence des bandes de l'ADN plasmidique chez la souche de *Lactobacillus acidophilus* CL 1285 (puits 1, 2,3).

La première bande se situe dans la région de 10.0 Kb, la deuxième bande se situe dans la région entre 8.0 et 6.0 Kb, la dernière bande est située dans la région de 4 Kb.

Par contre, nous n'avons pas trouvé d'ADN plasmidique chez *Lactobacillus casei*, suivant la méthode que nous avons appliquée.

On a déterminé la concentration d'ADN plasmidique chez *Lactobacillus acidophilus* CL 1285 à l'aide du Qubit Quantitation System (Invitrogen).

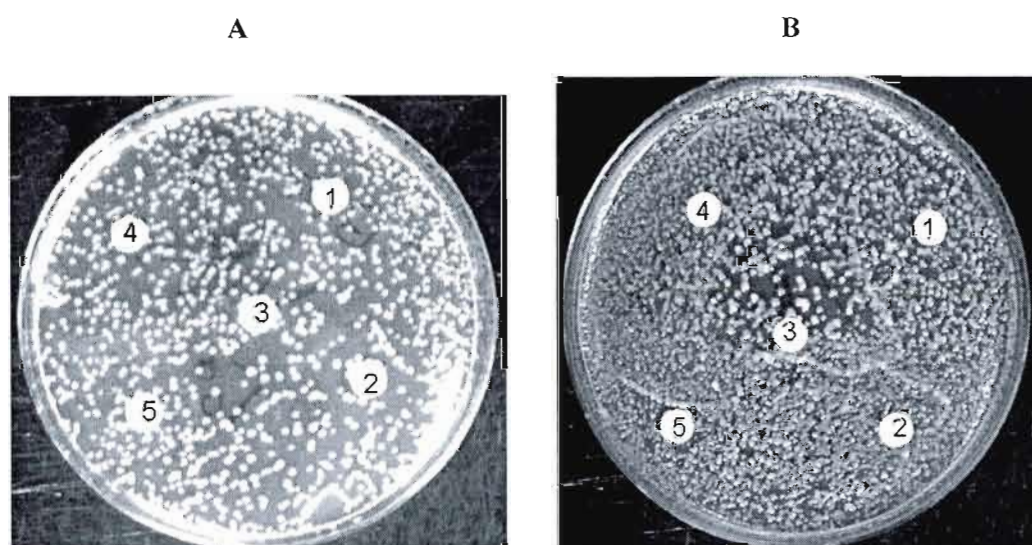
Nous avons utilisé le système de Qubit flurometer pour mesurer la quantité de l'ADN plasmidique chez *Lactobacillus acidophilus* CL 1285.

La concentration de l'ADN plasmidique isolé de *Lactobacillus acidophilus* CL 1285 a été 90 ng/µl.

3. Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques de *Lactobacillus acidophilus* CL1285 et de *Lactobacillus casei*

Les deux souches de bactéries lactiques ont été testées en présence des deux antibiotiques selon le test d'antibiogramme sur le milieu Muller Hilton (voir matériels et méthodes).

Figure 3 : Test d'antibiogramme en présence de *Lactobacillus acidophilus* CL1285 et *Lactobacillus casei* avec l'oxacilline et la méthicilline.



Antibiogramme en présence de *Lactobacillus acidophilus* CL1285 avec l'oxacilline (2, 3, 5), et la méthicilline (1, 4)

Antibiogramme en présence de *Lactobacillus casei* avec l'oxacilline (3, 4, 5) et la méthicilline (1, 2)

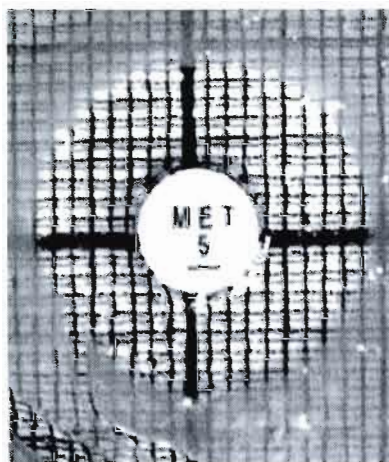
La figure 3 montre les résultats d'antibiogrammes déterminés en appliquant les deux souches de LAB. L'image A montre l'absence des zones d'inhibition de la croissance autour des disques d'oxacilline (2, 3, 5) et de méthicilline (1, 4) en présence de *Lactobacillus acidophilus* CL 1285.

L'image B indique les résultats semblables avec les disques de l'oxacilline (3, 4, 5) et de méthicilline (1, 2) en présence de *Lactobacillus casei*.

Ces résultats indiquent que les deux souches de LAB sont résistantes à l'oxacilline 1 μg et la méthicilline 5 μg .

Figure 4 : Zone d'inhibition de la croissance de *Lactococcus lactis ssp lactis* ATCC 11454 en présence de 5 μg de méthicilline

C



L'image C montre les résultats du test d'antibiogramme appliqué à la souche de *Lactococcus lactis ssp lactis* ATCC 11454 qui constitue le contrôle positif pour la mesure de l'activité des antibiotiques utilisés dans cette expérience

On peut observer une zone d'inhibition autour du disque de méthicilline (5 μg), ce qui démontre l'activité antibiotique qui a été appliquée dans le protocole expérimental.

4. Détection de l'activité antibactérienne des produits commercialisés par la compagnie BioK Plus à base de lait ou de soya envers le SARM 43

Pour démontrer l'activité anti-SARM des produits de BioK Plus, nous avons appliqué le test de diffusion sur gélose selon la méthode qui a été décrite dans la section de matériels et méthodes.

Les échantillons de 3 μ l des produits de BioK Plus ont été déposés sur la surface de gélose de MRS 1.2% dans les boîtes de Pétri et incubés en anaérobie pendant 24h à 37°C. Séparément, la souche de SARM 43 a été cultivée 24h à 37°C sur le bouillon BHI. On a transféré 200 μ l de cette culture dans 7 ml de gélose 0.7% de BHI. Ce mélange a ensuite été étalé sur la surface des boîtes de Pétri décrites plus haut. Le tableau 3 présente les résultats de ces expériences.

Tableau 3 : Diamètres de zones d'inhibitions de SARM 43 par les produits Biok Plus à base de lait et de soya.

Les produits de BioK Plus	Diamètre de zone d'inhibition (cm)			
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Moyenne
Soya	2.5	2.3	2.5	2.4
Lait	3.2	2.9	3.0	3.0
<i>Lactococcus cremoris</i>	0	0	0	0
<i>ATCC43300</i>	2.8	3	1.8	2.5

Chaque expérience présente la moyenne de trois tests effectués séparément.

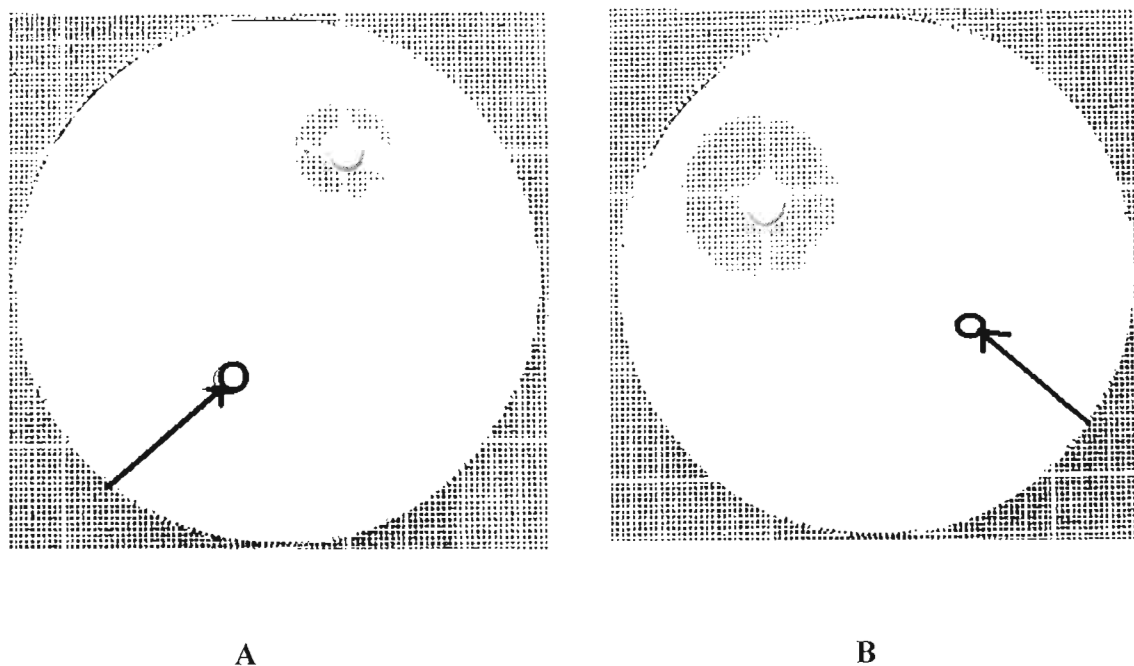
Dans l'échantillon de BioK Plus à base de lait, le nombre de cellules bactériennes a été égal à 330×10^6 CFU/ml. Dans 3 μ l nous avons donc 9.9×10^5 de cellules. Dans l'échantillon de BioK Plus à base le soya, le nombre de cellules bactériennes a été égal à 150×10^6 CFU/ml. Dans 3 μ l, on a 4.5×10^5 de cellules. La concentration de cellules de SARM 43 dans 7 ml de gélose 0.7% de BHI a été égale à 8.7×10^6 .

Les résultats obtenus montrent que les deux produits de BioK Plus inhibent efficacement la croissance de SARM 43. Nous constatons également que la quantité de cellules bactériennes dans le produit à base de lait est plus élevée que dans le produit à base de soya.

5. Comparaison de l'activité antibactérienne de *L. acidophilus* CL1285 et de *L. casei* envers le SARM 43

On a appliqué le test de diffusion sur gélose, lequel a été décrit dans la section de matériels et méthodes pour détecter l'activité antibactérienne de chaque souche de *Lactobacillus*.

Figure 5 : Zones d'inhibition de la croissance du SARM 43 isolat clinique par les bactéries lactiques



La partie A démontre la zone d'inhibition de la croissance de SARM 43 en présence de *L. casei*.

La partie B démontre la zone d'inhibition de SARM 43 en présence de *L. acidophilus* CL1285

Les flèches indiquent la place des gouttes de la culture bactérienne de *Lactococcus lactis* ssp *crémoirs*, cette souche est appliquée comme contrôle négatif du test et présente l'absence des zones d'inhibition du SARM.

6. Recherche des meilleures conditions pour la préparation de mélange de *L.casei* et *L.acidophilus*

Pour faire le mélange de 2 souches de *Lactobacillus acidophilus* et de *Lactobacillus casei* on a recherché la proportion entre les 2 souches pour trouver la meilleure condition de l'expression de l'activité antibactérienne.

Tableau 4 : Rapport quantitatif de *Lactobacillus acidophilus* CL1285 et de *Lactobacillus casei* dans les cultures mixtes et la mesure des zones d'inhibition de la croissance de SARM 43

Cultures mixtes	Le diamètre en cm des zones d'inhibition en présence de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 et de <i>Lactobacillus casei</i>				L'absence des zones d'inhibition en présence de <i>Lactococcus cremoris</i>
4 µl <i>L. acidophilus</i> plus 6 µl <i>L. casei</i>	2.5	3.3	3.0	2.9 *	-
8 µl <i>L. acidophilus</i> plus 2 µl <i>L. casei</i>	3.0	3.5	3.3	3.2 *	-
6 µl <i>L. acidophilus</i> plus 4 µl <i>L. casei</i>	3.0	2.5	3.5	3.0 *	-
5 µl <i>L. acidophilus</i> plus 5 µl <i>L. casei</i>	3.5	3.3	3.6	3.4 *	-
2 µl <i>L. acidophilus</i> plus 8 µl <i>L. casei</i>	2.6	3.0	2.7	2.7 *	-

Le test a été effectué trois fois avec les différents rapports de 2 souches de bactéries lactiques et les moyennes (*)ont été calculées à partir des mesures venant de 3 expériences séparées.

Un contrôle négatif du test (absence de zone) a été fait en présence de *Lactococcus cremoris*.

Suivant les résultats présentés dans le tableau 4, le rapport de souches lactiques 1: 1 démontre les plus grandes zones d'inhibition de SARM 43.

7. Mesure de la sensibilité de 10 souches de SARM individuelles en présence de *L.acidophilus* et de *L.casei*.

On a appliqué le test de diffusion sur gélose pour détecter l'activité antibactérienne envers les dix souches de SARM.

On a testé le mélange de 2 souches de LAB envers 10 souches de SARM pour démontrer l'activité antibactérienne des bactéries lactiques.

Tableau 5 : Mesures des zones d'inhibition (cm) de la croissance de 10 souches cliniques de SARM séparément en présence du mélange des souches de *Lactobacillus acidophilus* CL1285 et de *Lactobacillus casei*.

Les souches cliniques de SARM	Le diamètre en cm des zones d'inhibition en présence de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL 1285				Le diamètre en cm des zones d'inhibition en présence de <i>Lactobacillus casei</i>				L'absence des zones d'inhibition en présence de <i>Lactococcus cremoris</i>
ATCC 43300	2	2.3	2.1	2.2*	2.5	2.4	2.2	2.4 *	-
43	3	2.8	3	2.9*	2	2.2	2	2*	-
64	2.5	2.7	2.4	2.5*	2	2.1	2.2	2.1*	-
75	2	2	1.8	1.9*	1.2	1.6	1.5	1.4*	-
27	2.5	2.3	2.5	2.4*	2	2.1	2	2*	-
61	1.6	2	1.5	1.7*	1.8	2	2	1.9*	-
22	2.2	1.7	2	1.9*	2	2.3	2.1	2.1*	-
18	2	1.8	2	1.9*	2.5	2.3	2	2.2*	-
69	2.2	2	2	2*	2.3	2.5	2.5	2.4*	-
80	2	2.1	2	2*	2.5	2.4	2.5	2.4*	-
36	3	3	2.9	2.9*	3	2.8	2.9	2.9*	-

Le test a été effectué trois fois pour chaque souche clinique de SARM et la souche standard ATCC 43300 et Les moyennes(*) ont été calculées à partir des mesures venant de 3 expériences séparées.

Un contrôle négatif du test (absence de zone) a été fait en présence de *Lactococcus cremoris*.

Ces résultats indiquent que les deux souches de LAB mélangées inhibent la croissance de dix souches cliniques de SARM avec différents diamètres de zones d'inhibition.

Les deux souches à l'étude, *Lactobacillus acidophilus* CL 1285 et *Lactobacillus casei* mélangées ont exprimé l'activité antibactérienne envers les dix souches cliniques de *Staphylococcus aureus* résistantes à la methiciline (SARM). Tableau 5.

8. Détection de l'activité antibactérienne chez le *L. acidophilus* CL1285 et le *L.casei* envers le mélange de dix souches de SARM.

On a appliqué le test de diffusion sur gélose pour détecter l'activité antibactérienne envers les dix souches de SARM.

On a préparé des pré-cultures bactériennes séparément de *L. acidophilus* et *L. casei* sur le milieu de lait (PM), et des pré-cultures bactériennes de dix souches de SARM séparément (18, 22, 27, 36, 43, 61, 64, 69, 75, 80) sur le même milieu. Toutes ces cultures ont été incubées pendant 24h à 37°C. Par la suite, on a déposé 3µl de chaque culture bactérienne de *L. acidophilus* et *L. casei* sur la gélose (1,2%) qui contient 7ml de MRS. On a incubé les boîtes pendant 24h à 37°C dans les conditions d'anaérobies (Gaz Pak system). À partir des cultures de SARM séparées sur le milieu de lait peptonisé de 24h, on a préparé un mélange de dix souches de SARM, en prélevant 500µl de chaque souche. Après la préparation de mélange de 10 souches, on a préparé immédiatement la deuxième couche de gélose 0.7 %, qui contient 7 ml de BHI (Brain Heart Infusion) et le 200 µl de mélange de SARM et on l'a étalé sur la première couche de gélose (1.2%) contenant les bactéries lactiques mélangées. Les boîtes ont été incubées pendant 24h à 37°C, et on a mesuré les zones d'inhibition de la croissance de SARM.

Le test de diffusion sur gélose a été complété en présence d'une souche de bactéries lactiques *Lactococcus cremoris* (contrôle négatif) et de la souche de SARM ATCC 43300 (contrôle positif).

Le tableau 6 présente les diamètres de zones d'inhibition de la croissance de mélange de dix souches de SARM par le mélange de deux souches de bactéries lactiques *L. acidophilus* et *L. casei*.

Tableau 6 : Zones d'inhibition de la croissance de dix souches de SARM mélangé en présence de *Lactobacillus acidophilus* CL 1285 et de *Lactobacillus casei*

Les souches bactériennes	Diamètre de zone d'inhibition (cm)			
	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Moyenne
<i>L. casei</i> + <i>L. acidophilus</i> CL1285 1 :1	3.2	3.5	3.3	3.3
<i>Lactococcus cremoris</i>	0	0	0	0
ATCC43300	3	2.6	2.7	2.8

La concentration de cellules LAB dans le volume de 3µl de *L. acidophilus* CL1285 a été de 3.8×10^6 , celle de *L. casei* a été de 9.6×10^6 et le mélange des deux souches dans le même volume a été de 6.9×10^6 cellules. La concentration de cellules de dix souches de SARM dans 7 ml de gélose 0.7% a été de 1.46×10^7 .

Ces résultats confirment que les souches de bactéries lactiques démontrent l'activité antibactérienne non seulement contre une souche de SARM 43, mais également contre un mélange de dix souches de SARM.

9. Recherche en milieu liquide de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques de Biok Plus envers le SARM 43.

Dans cette expérience, nous avons recherché la sensibilité de SARM envers les bactéries lactiques dans un milieu de lait peptonisé ; les 2 types de bactéries ont été cultivées dans les mêmes conditions environnementales.

La préparation de toutes les pré-cultures bactériennes après décongélation a été effectuée sur le milieu liquide en inoculant 500µl de chaque souche séparément dans un tube contenant 10 ml de milieu de lait peptonisé PM (Sigma). Toutes ces cultures ont été cultivées pendant 24h à 37°C et à partir de chacune de ces cultures de 24h, l'échantillon de 100µl a été transféré dans les tubes contenant 10 ml de milieu frais de PM. Par la suite, les tubes inoculés avec 100 µl de la culture bactérienne ont été à leur tour incubés 24h à 37°C.

Par la suite, ces pré-cultures ont été inoculées par 100 µl de chaque souche séparément dans 10 ml de milieu PM et incubées 24h à 37°C. Ces cultures ont été appelées *monocultures*.

La croissance de bactéries lactiques et de SARM 43 sur le lait peptonisé est présentée dans le tableau 7.

À partir des monocultures, on a préparé la culture mixte. Elle contenait le mélange de trois souches bactériennes : *L.acidophilus* CL1285, *L.casei* et le SARM 43. Pour ces 3 souches, les conditions de cultures continues ont été exécutées suite au passage de 500 µl de la culture mixte de 24h dans le milieu PM frais. Après l'incubation de 24h à 37°C, ces cultures seront considérées comme cultures de 48h. On a appliqué le même principe en préparant la culture de 72h à partir de la culture de 48h (Schellenberg et al., 2006).

Tableau 7 : Nombre de bactéries viables (CFU/ml) dans les monocultures

Temps d'incubation à 37 °C	<i>L. acidophilus</i> CL 1285 x 10 ⁸ /ml	<i>L.casei</i> x 10 ⁸ /ml	SARM x 10 ⁸ /ml
24 h	1.29	3.20	3.76
48 h	3.54	2.33	3.80
72 h	1.34	2.26	2.30

La préparation des mélanges de souches lactiques avec le SARM a été précédée par les mesures de la croissance de bactéries sur le milieu appliqué. Chaque souche a été cultivée

séparément en condition de monoculture dans le milieu liquide de lait peptonisé. Le nombre de bactéries viables a été déterminé dans 100µl de monoculture par la méthode standard de comptage de colonies (CFU), sur les boîtes de Pétri contenant le lait peptonisé et gélosé (la gélose 1.2%).

Le tableau 8 présente l'évaluation de la concentration de cellules bactériennes immédiatement après l'inoculation, mais avant l'incubation à 37°C. La description présente des volumes de 100µl et 500µl de la suspension bactérienne qui se trouve dans 10ml de milieu PM.

Tableau 8: Nombre de cellules CFU x 10⁵ dans 100µl et 500µl avant incubation

Les souches bactériennes	Temps d'incubation à 37°C					
	24h		48h		72h	
	100µl	500µl	100µl	500µl	100µl	500µl
<i>L. acidophilus</i> CL1285	13	65	36	177	14	67
<i>L. casei</i>	32	160	18	89	33	163
SARM 43	38	188	36	180	23	115

Suivant la procédure de la préparation des cultures mixtes, en se basant sur les données présentes dans les tableaux 7 et 8 dans les tubes de 10ml de milieu PM, on a déterminé la concentration de cellules de LAB et de SARM. À partir de ce nombre de cellules qui a été mesuré, a servi pour la préparation des cultures mixtes.

Avant l'incubation de 24h, dans les monocultures, on a eu une concentration de cellules viables de SARM égale à 3,76 CFU x 10⁶/ml, de *L. casei* égale à 3,2 x 10⁶/ml et de *L. acidophilus* CL1285 égale à 1,3 x 10⁶/ml (tableau 9).

La procédure de la préparation de culture mixte a été la suivante : dans 10 ml de PM on a transféré 100µl de *L. acidophilus* + 100µl de *L. casei* + 100µl de SARM. Tenant compte de la procédure de préparation de culture mixte, nous pouvons estimer la concentration des cellules viables dans une solution de 10 ml de PM contenant les 3 souches.

Après l'incubation de 24h, 100 ml de la culture de *L. acidophilus*, de *L. casei* et le SARM 43 ont été transférés dans 10ml de milieu frais de PM pour former la culture continue de 48 et 72 h mis en incubation à 37°C pendant 24 h.

Pour quantifier la concentration de bactéries dans une culture mixte contenant le mélange de souches *L. acidophilus*, *L. casei* et SARM 43, les mesures de CFU ont été effectuées à l'aide de deux milieux solides (MSA, PM). Sur le milieu de lait, toutes les souches sont capables de croître, tandis que sur le deuxième milieu sélectif le MSA, seulement les souches de SARM peuvent former les colonies (CFU). Après l'incubation à 37°C, le nombre de cellules a été déterminé dans la culture mixte à l'aide du milieu gélosé de lait peptonisé, et parallèlement sur le milieu sélectif Mannitol Salt Agar (MSA).

Tableau 9 : Nombre de bactéries viables dans les cultures mixtes

Temps d'incubation à 37°C	Lait peptonisé (PM) CFU x 10 ⁸ /ml	MSA x 10 ³ /ml
24 h	3.65	2.99
48 h	2.12	0
72h	1.07	0

PM Peptonized Milk, milieu non sélectif

MSA Mannitol Salt Agar, milieu sélectif

Après 24h d'incubation, nous avons déterminé sur le milieu sélectif MSA la présence de seulement 299 colonies de SARM 43.

Dans cette expérience nous avons réussi à démontrer l'éradication de 99.9% de SARM dans une culture mixte avec les bactéries lactiques. L'incubation de 24h mettant en contact direct ces deux types de microorganismes (*L. acidophilus* et *L. casei*) a clairement démontré l'activité anti-SARM.

10. Activité antibactérienne des bactéries lactiques d'origine européenne contre le SARM.

Dans la deuxième étape de la recherche, nous avons étudié les souches européennes, *Lactobacillus acidophilus* 8/4, *Lactobacillus salivarius* et *Lactobacillus delbrueckii*, provenant de la collection de Dr Bielecka (Département de microbiologie alimentaire Académie des Sciences Polonaises, Olsztyn, Pologne).

10.1 Identification des bactéries lactiques par la fermentation des sucres en se basant sur le test de API CHL 50 Medium.

Dans le but de confirmer la fermentation des sucres de ces souches et pour pouvoir identifier leur phénotype, on a appliqué la modification du test API CHL 50 Medium (Murray et al 1995).

Tableau 10 : Résultats de test API CHL 50 Medium en présence de Mannitol et Cellobiose

Fermentation des glucides	<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> 8/4	<i>Lactobacillus</i> <i>salivarius</i> AWH	<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii</i>
Mannitol	+	+	-
Cellobiose	+	-	-

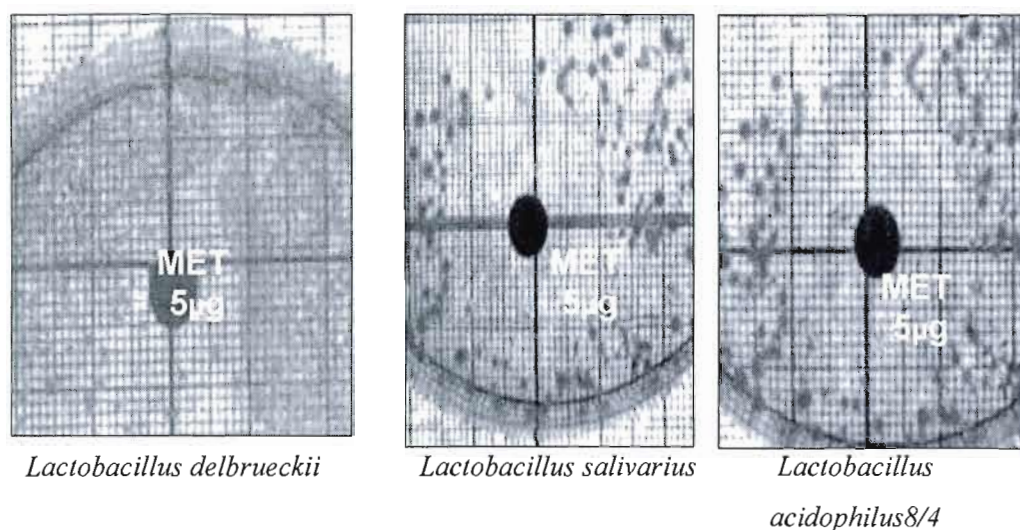
En se basant sur ce profil biochimique, on a confirmé le phénotype de trois souches de *Lactobacillus* : *L.acidophilus* 8/4, *L salivarius* AWH, et *L. delbrueckii*.

10.2 Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques de *L. acidophilus*,

L. salivarius et *L. delbrueckii*

Pour déterminer la sensibilité ou la résistance de trois souches européennes à la méthicilline (5µg), on a appliqué le test d'antibiogramme sur le milieu Muller Hinton décrit dans la partie de matériels et méthode (IDSR 2006).

Figure 6 : Test antibiogramme en présence de *Lactobacillus acidophilus* 8/4, de *Lactobacillus salivarius* AWH et de *Lactobacillus delbrueckii* avec 5µg de la méthicilline



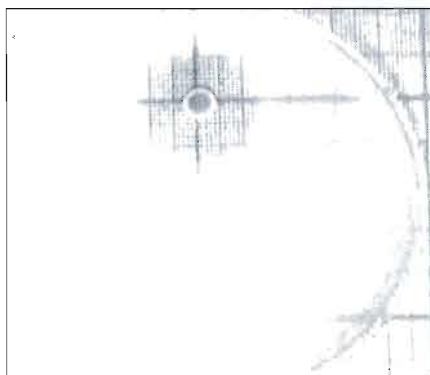
Les résultats ont démontré que les souches européennes sont sensibles à la méthicilline 5µg.

10.3 Comparaison d'activité anti-SARM chez les souches européennes séparées et mélangées

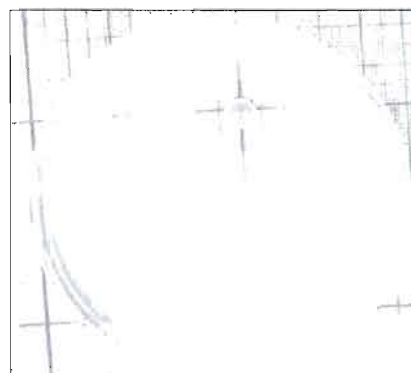
On a appliqué le test de la diffusion sur gélose qui a été précédemment décrit dans la section de matériels et méthodes.

Les 3 souches de *L. acidophilus* 8/4, *L. delbrueckii* et *L. salivarius* ont été mélangées suivant la procédure du test de diffusion en gélose.

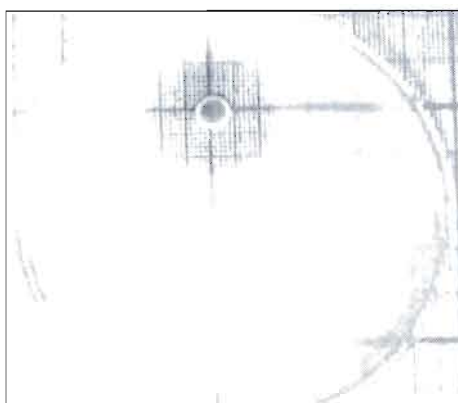
Figure 7 : Zones d'inhibition de la croissance de SARM 43 clinique en présence de *Lactobacillus acidophilus* 8/4, *Lactobacillus salivarius* AWH, *Lactobacillus delbrueckii*



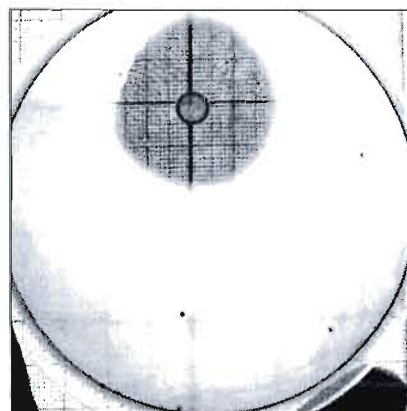
Lactobacillus salivarius (3cm)



Lactobacillus delbrueckii (2.1cm)



Lactobacillus acidophilus
(3.2 cm)



L. acidophilus + *L. salivarius*
+ *L. delbrueckii* (5 cm)

Les résultats démontrent que le mélange de 3 souches a donné une inhibition plus efficace que les souches testées séparément. Le mélange de 3 souches de LAB a donné une

zone d'inhibition de croissance de SARM (5 cm), tandis que les souches testées séparément ont donné (3.2 cm, 3cm, 2.1 cm) Figure 7 et tableau 11 .

Tableau 11 : Zones d'inhibition (cm), de la croissance de la souche clinique SARM 43 en présence de *Lactobacillus acidophilus* 8/4, *Lactobacillus salivarius* AWH, *Lactobacillus delbrueckii*

Souches des bactéries lactiques	Diamètre des zones d'inhibition (cm)			Moyenne (cm)
<i>Lb. acidophilus</i>	3	3.2	3	3
<i>Lb. salivarius</i>	3.5	3.2	3	3.2
<i>Lb. delbrueckii</i>	2.1	2.2	2.1	2.1
<i>Lb .acidophilus</i> + <i>Lb .salivarius</i> + <i>Lb .delbrueckii</i>	5	3.5	4.4	4.3

Le test a été effectué trois fois pour chaque souche de LAB séparément et pour le mélange de 3 souches.

DISCUSSION

On a démontré que les 2 types de LAB utilisées (les souches européennes (Bazo et al .,2007) et les souches de Biok Plus (Karska et al .,2010)) possèdent une activité antibactérienne contre le SARM (Smoragiewicz et al .,2008, USA patent No 60 /876 ,460).

On a également découvert cette activité antibactérienne dans les produits commercialisés de la compagnie BioK Plus, on a émontré que le nombre de cellules bactériennes viables (CFU), sur le milieu de lait, était plus élevé que celui sur le soya (tableau 3). Par contre, les autres chercheurs n'ont pas trouvé la viabilité avec leurs produits industriels de probiotiques (Wen et al., 2006).

On a également établi les conditions de croissance des souches de LAB et de SARM. En même temps on a choisi les milieux naturels tels que le lait et la gélose de sang. Ceci a permis d'obtenir une concentration de cellules indispensable pour démontrer l'activité antibactérienne des souches de LAB (tableau 4). Selon l'application de cette procédure, on a évité les variations et on a obtenu des résultats reproductibles, ce que n'ont pas pu avoir les autres. (Annuk et al 2003, Ammor et al 2006., a, Normanno et al .,2007).

La vérification des pathogènes utilisés dans cette recherche, a été appliquée par la méthode de PCR ; ceci a confirmé la présence de gène *mecA* chez les souches de SARM ainsi que le gène de *coagulase*.

Dernièrement les chercheurs européens ont établi de nouvelles normes, lesquelles déterminent si l'organisme peut être considéré comme probiotique de bonne qualité (Chesson, 2001)

En règle générale un organisme probiotique ne doit pas être résistant aux antibiotiques, s'il est résistant le gène de la résistance devrait être situé sur le chromosome (Chesson, 2001) mais pas sur le plasmide ou sur d'autres éléments transférables aux autres microorganismes.

Les souches de LAB venant de BioK sont résistantes aux antibiotiques. Elles ont été testées pour la présence d'ADN plasmidique (Chesson, 2001).

Les résultats obtenus ont démontré que seulement *L. casei* ne porte pas de plasmides et c'est elle qui pourrait être considérée comme probiotique suivant les règles européennes. Par contre la souche de *L. acidophilus* a démontré la présence des plasmides (partie résultats). Cette souche *Lb* devra être étudiée pour déterminer si les gènes de résistance aux antibiotiques sont situés sur le chromosome.

Les discussions sur les problèmes de définition des probiotiques ne sont pas encore résolues. Présentement les bactéries lactiques ayant les capacités fermentatives sont considérées comme des ingrédients indispensables dans la préparation des aliments. Ceci est non seulement une méthode de préservation de produit mais aussi de préservation de la santé du consommateur. (Rodgers, 2008).

L'expression « probiotique » a été déjà remplacée par « culture de microorganisme qui aide » (Rodgers 2008). Cette expression précise de multiples fonctions que le microorganisme exerce, étant présent dans les produits alimentaires. (Wilson 2005, Wilson et al 2008, Wilson 2008).

Nous avons réussi à avoir optimisé les résultats d'inhibition, quand on a fait la co-culture de *L.casei* + *L.acidophilus* avec les différentes concentrations de chaque souche, et on a eu le plus grand diamètre de zone d'inhibition avec la concentration de 1 :1

Les tests de l'activité antibactérienne produits par LAB sur le milieu solide ont été appliqués non seulement sur les souches individuelles pathogènes de SARM, mais aussi sur le mélange de ces 10 souches .

Pour confirmer les résultats d'activité antibactérienne obtenue sur le milieu solide nous avons appliqué le test sur le milieu liquide du lait dans les conditions d'interaction entre les deux types de microorganismes.

La concentration de ces deux types de microorganismes a été contrôlée de façon quantitative pour pouvoir calculer le niveau d'éradication .de pathogènes par LAB. En se

basant sur ce calcul on a obtenu un pourcentage de 99,9 % d'éradication du SARM en présence de LAB (tableau 9).

Nos résultats sur le milieu liquide ont été reproductibles, tandis que d'autres chercheurs n'ont pas réussi à avoir des résultats comparables (Ammor et al .2006a, Normanno et al, 2007).

Normalement il existe 2 phénotypes de la résistance contre les antibiotiques : la résistance intrinsèque et la résistance acquise (Chesson, 2001).

Les résultats de notre recherche ont démontré la présence de l'ADN plasmidique chez le *Lactobacillus acidophilus* (figure 2). Par contre on n'a pas trouvé l'ADN plasmidique chez le *Lactobacillus casei*. Donc même si la souche de *L.casei* est résistante contre les antibiotiques, les gènes de la résistance vont être placés sur l'ADN chromosomique ; dans ce cas, le danger est moindre pour la transmission des gènes de la résistance aux autres bactéries (Chesson 2001).

Par contre dans le cas *L.acidophilus*, on a trouvé des bandes plasmidiques (figure 2), ce qui indique la présence des plasmides pour cette souche, mais même si la souche est résistante aux antibiotiques, on n'a pas encore déterminé la localisation des gènes qui contrôlent la résistance (Chesson 2001).

En conclusion, nos résultats montrent l'activité antibactérienne des bactéries lactiques dans la mono culture et la poly culture, cet effet antagoniste peut varier selon la souche et le milieu de culture.

Dans la poly culture, on a obtenu une inhibition plus efficace que dans une seule souche, le mélange de 3 souches de LAB a donné une plus grande zone d'inhibition qu'une seule souche séparément (Matto et al 2006).

La recherche sur les bactéries lactiques a été appliquée *in vivo* dans l'hôpital Maisonneuve-Rosemont (Beausoleil et al, 2007) pour traiter les patients qui ont été infectés avec le *Clostridium difficile*. Les chercheurs ont découvert une inhibition de la progression de *C.difficile* en présence des souches de BioK Plus .

CONCLUSION

Le but de cette recherche a été de caractériser les interactions entre les bactéries lactiques et le SARM. Nous avons montré que les bactéries lactiques produisent l'activité antibactérienne *in vitro* contre le SARM, sur les milieux liquide et solide.

Les souches des bactéries lactiques utilisées dans cette étude sont capables de produire des substances antibactériennes permettant d'éliminer la présence de SARM.

L'effet antibactérien peut varier selon la souche de bactéries lactiques et selon les conditions de cultures. L'utilisation de ces bactéries dans un traitement probiotique peut représenter une alternative à l'utilisation des antibiotiques.

Cette étude montre le potentiel des bactéries lactiques et l'effet antagoniste entre les probiotiques et le SARM, pour résoudre au moins le problème d'infections avec les bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

D'autres études seront nécessaires pour en savoir plus sur l'action des probiotiques et pour comprendre les possibilités et les limites du contrôle des bactéries pathogènes. Des expériences *in vivo* utilisant des souches de bactéries probiotiques sont actuellement en cours pour examiner l'efficacité du contrôle des bactéries pathogènes.

La recherche dans le domaine des probiotiques, particulièrement leurs interactions avec des bactéries pathogènes mérite un programme de recherche approfondie, ce qui permettra d'éclairer davantage ces interactions qui sont toujours très complexes.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Aguirre M. et K. Collins. 1993. *Lactic acid bacteria and human clinical infection. Journal of applied bacteriology*. 75:95-107.
- Alvarez-Olmos, M. T. et Richard A. Oberhelman. 2001. *Probiotic Agents and Infections Diseases: A Modern Prespective on a Traditional Therapy, Clinical Infections Diseases, 2001,32: 1567- 157.*
- Ammor S., G. Tauveron , E. Dufour et I. Chevalier. 2006. *Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1. Screening and characterization of the antibacterial compounds.* Food Control. a; 17:454-61.
- An, Y. H., R. B. Dickinson et R. J. Doyle. 2000. *Mechanisms of Bacterial Adhesion and Pathogenesis of Implant and Tissue Infection Dans : Handbook of bacterial Adhesion : Principles, Methods, and Applications*, Y.H. AN & R.J. Frideman (Éditeurs), Humana Press ,Totowa NJ. 1-2.
- Anderson M. E. C., S. L. Lefebvre et S. J. Weese. 2008. *Evaluation of prevalence and factors for methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference.* Veterinary microbiology, 129: 410-7
- Annear, D.I. 1984, *methicillin- resistant Staphylococcus aureus.* Med, J. Avst 140:144-145.
- Annuk, H., J. Shchepetova, T. Kullisaar, E. Songisepp et al. 2003. *Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotics candidate, Journal of Applied Microbiology.*; 94: 403-12.
- Balfour Sartor, R. 2004. *Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: Antibiotics, probiotics and prebiotics Gastroenterology.* 126: 1620-33.
- Barnes,E. M., C. S. Impey et B. J. H. Stevens. 1979. *Factors affecting the incidence and antisalmonella activity of the anaerobic caecal flora of the young chick, Journal of Hygiene, Cambridge.* 82: 263- 283.
- Bazo M. Wysocki B. K. Smoragiewicz W. Mai 2007. *L'effet de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques sur le Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM), ACFAS , Trois-Rivières.*

- Beausoleil M, N. Fortier, S. Guenette, A. L'Écuyer, M. Savoie, M. Franco et al. 2007. *Effect of a fermented milk combining Lactobacillus acidophilus CL1285 and Lactobacillus casei in the prevention of antibiotic associated diarrhea : A. randomised, double-blind placebo-controlled trial* .Canadian Journal Gastroenterology. 21: 732-6.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., Smoragiewicz, W., Smieszek, M., 1998. *Interaction of bifidobacterium and Salmonella, during associated growth*. International Journal of Food Microbiology, 45:151-155.
- Canada communicable disease report, CCDR, 2005. *Surveillance methicillin- resistant Staphylococcus aureus in Canadian Hospitals – A Report*. Update from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program.
- Chambers, J. 2001. *Recherche sur la réduction du risqué de contamination par la Salmonelle*, Programme de recherche sur les aliments, Agriculture et Agroalimentaire Canada. Publication du gouvernement Canadien, Guelph (Ontario).
- Chesson, A., 2001, *Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance*. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate – General.
- Daigle, F., M. Bielecka & W. Smoragiewicz . 2002. *Antibacterial activity probiotic bacterial strains against avian foodborn pathogens in vitro* Dans: *of Proceedings of the 83 rd Annual Meeting Conference of research Workers in Animal Diseases*, R.P. Ellis (Éditeur) St. Louis, Missouri, November 10-12.
- Daigle, F., M. Bielecka & W. Smoragiewicz, B. Karska-Wysocki, 2004. *Activité antibactérienne de bactéries lactiques contre des bactéries entéro pathogènes aviaires* 72. Congrès de l'ACFAS, D-107 Microbiologie, virologie et immunologie.
- Daigle, F., 2003. *Étude de l'activité antibactérienne de bactéries lactiques contre des bactéries entéro-pathogènes aviaires*. Mémoire M.Sc, Université du Québec à Montréal.
- Davies, J., 1997. *Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants*. In: Chadwick, D. J., Goode, J. (Eds.), *Antibiotic Resistance Origins Evolution, Selection and spread*, CIBA Foundation Symposium, vol. 207. Wiley Chichester p.15-27.
- De Lencastre, H., B. L. De Jonge, P. R Matthews et Tomasz A. 1994. *Molecular aspects of methicillin-resistant in Staphylococcus aureus* Journal of Antimicrobiol chemotherapy, 33, 7-24.

- De Vuyst, L. et B. Degeest. (1999). *Heteropolysaccharide from Lactic acid bacteria*, FEMS Microbiology Reviews, 23, 153-177.
- Durlu-Ozkaya, F. B. Aslim et M. Taha Ozkaya .2005. *Effect of exopolysaccharides (EPS), produced by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria*, J, LWT.
- Goepfert, J.M. et R, Hicks. 1968. *Effect of Volatile Fatty Acids on Salmonella Typhimurium*, *Journal of bacteriology* p 956 – 958, *American Society of Microbiology* .
- Haines, W. C. et L. G. Harmon. 1973. *Effect of selected lactic acid bacteria on growth of Staphylococcus aureus and production of enterotoxin*. *Applied Microbiology*. 25 (3): 436-41.
- Hamilton-Miller, J. M. 2004. *Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 23: 209-12.
- Hansen, E. B. 2002. *Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future*. *International Journal of Food Microbiology*. 78: 119-31.
- Ho, P. L, 2003 *Carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, cefazidime-resistant Gram-negative bacilli, and vancomycin-resistant enterococci before and after intensive care unit admission*, *Crit CareMed*. 31, p.1175-1182.
- Huttunen E., K. Noro et Z. Yang. 1995. *Purification and identification of antimicrobial substances produced by two Lactobacillus casei strains*. *International Dairy Journal* 5:503-13
- IDSR lab meeting. 2006. *Sensibilité aux agents antimicrobiens*, Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services, Atlanta.
- Jacobsen, C. N., V. Rosenfeldt, A. Nielsen, E. Hayford, P. L. Moller et al. 1999. *Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans* . *Applied & Environmental Microbiology* .65 (11) 4949-56.
- Karska-Wysocki. B., M. Bazo, W. Smoragiewicz, January 2010. *Antibacterial activity of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. *Journal of Microbiological Research*, volume 165 ,issue 7.
- Karska-Wysocki, B., G. Szatmari, B. Barette, M. Bryatly MD. 1996. *Characterization of a new restriction endonuclease, Lia G1 produced by Lactococcus lactis subsp. cremoris G2*. *Life science conference Ottawa*, p.88.

- Klare, I., C. Konstable et W. WITTE. 2005. *Evaluation of new broth media for Microdilution antibiotic susceptibility testing of Lactobacilli, Pediococci Lactococci and Bifidobacteria Applied and Environmental Microbiology*.
- Kuroda M., T. Baba, H. Yuzawa, L. Cui, J. Q. Lian et al. 2001. *Whole genome sequencing of methicilline-resistant Staphylococcus aureus*. The Lancet; 357:1225-98
- Labbé A. C., L. Poirier, D. Maccannell, T. Louie, M. Savoie, C. Béliveau, M. Laverdière et J. Pépin. 2008. *Clostridium difficile infections in a Canadian tertiary care hospital before and during regional epidemic associated with the BI /NAP1 /027 strain*. Antimicrob Agents Chemother: 52(9) :3180-7.
- Lee, Y., K. Nomoto , S. Salminen, K. Sherwood Omoto, G. L. Salminen. 1999. *Handbook of probiotics*. John Wiley & Sons Inc. New York, pp. 1-23.
- Libert M., M. Elkholti, J. Massaut, R. Karmali, G. Maskart et S. Cherifi. 2008. *Risk factors for methicillin-resistance and outcome of Staphylococcus aureus blood stream infection in a Belgian university hospital*. Journal of Hospital Infection: 68:17-24.
- Luquet, F. M. 2003. *Lactic acid ferment comprising a particular strain of Lactobacillus acidophilus and use thereof*. US Patent 6607905.
- Makras. E. et L. De Vuyst. 2006. *The in vitro inhibition of Gram-negative Pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids*. International Dairy Journal 16, 1049-1057.
- Maragkoudakis P. A., G. Zoumpopoulou, G. H. Miaris, G. Kalantzopoulos B. Pot et E. Tsakalidou. 2006. *Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products* International Dairy Journal: 16 : 189-99
- Martin W. J. 1971. *Practical method for isolation of anaerobic bacteria in the clinical laboratory*. Appl. microbial. 22:1168-1171.
- Martin, W.J. 1974. *Isolation and identification of anaerobic bacteria in the clinical laboratory*. Mayo Clin Proc. 49: 300-308.
- Massi, M., B. Vitali, F. Federici, D. Matteuzzi et P. Brigidi. 2004. *Identification based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic Lactobacillus strains colonizing the human gut and vagina*. Journal of Applied Microbiology; 96:777-86.
- Mathur S. et R. Singh, 2005. *Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria: a review* International Journal of Food Microbiology, 105, 281-295.
- Matto J., R. Fonden, T. Toevalen, A. von Wright, T. Vilpponen Salmela, R. Satokari et al. 2006. *Intestinal survival and persistence of probiotic Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei fermented milk*. Letters in Applied Microbiology ;44:314-9

- Millette, M., C. Le Tien, W. Smoragiewicz et M. Lacroix. 2007. *Inhibition of Staphylococcus aureus on beef by nisin-containing modified alginate films and beads*. Food Control; 18: 878-84.
- Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover et R. H. Tenover. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. Sixth Edition, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Mylotte J. M. 1996, *Staphylococcus aureus* In Ulmsted R. N. O. (ed), *Infection Control and Applied Epidemiology, Principales and Practices*, St-Louis, Mosby pp. 78-1: 78-12.
- Nomoto K. 2005. *Prevention of infection by Probiotics*. Journal of Bioscience and Bioengineering; 100: 583-92
- Normanno G., M. Corrente, G. La Salandra, A. Dambrosio, N. C. Quaglia, A. Parisi, et al. 2007. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in foods of animal origin products in Italy*. International journal of Food Microbiology: 117:219-22
- Novick, P. R., P. Schevert et A. Ruzin. 2001. *Pathogenicity and Resistance Islands of Staphylococci*, Journal of Microbes and Infections, 3, 585-594
- Rafter, Joseph. 2003. *Probiotics and colon cancer*, Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, Volume 17, Issue 5, Pages 849-859
- Regnault, J. P, 2002. *Éléments de Microbiologie et Immunologie*.
- Reid G., M. E. Sanders, H. R. Gaskins, G. R. Gibson, A. Mercenier, R. Rastall et T.R. Klaenhammer. 2003. *New scientific paradigms for probiotics and prebiotics*. J Clin. Gastroenterol 137, 105-118.
- Roghmann MC, et L. McGrail. 2006. *Novel ways of preventing antibiotic-resistant infections: What might the future hold?* American Journal of infection Control 2006; 34: 496-75
- Rolinson, G. N. et E. J. Russell. 1971. *A new method for antibiotic sensitivity testing lancet ii*: 745.
- Schellenberg,, J. W. Smoragiewicz, et B. Karska-Wysocki. 2004. *Competitive Exclusion of methicillin- resistant S.aureus (MRSA) by Lactic Acid Bacteria*. Ottawa Life Science Council, Bionorth, Conferences p-30.
- Schellenberg,, J. W. Smoragiewicz, et B. Karska-Wysocki. 2005. *A Rapid method combining immunofluorescence and flow cytometry for improved understanding of competitive interactions between lactic acidbacteria (LAB) and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) in mixed culture*. J. Microbio. Methods.

- Schellenberg, J. 2005. *La compétition exclusive entre les bactéries lactiques et Staphylococcus aureus résistante à la méthicilline (SARM)*. Mémoire M.Sc Université du Québec à Montréal.
- Simor A. E., M. Often-Agostini, E. Bryce, K. Green, A. McGeer, M. Mulvey et al. 2001. *The evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Canadian hospitals: 5 years of national surveillance*. CMAJ (Canadian Medical Association Journal) 165 : 21-6
- Smoragiewicz, W., B. Karska-Wysocki, M. Bazo, M. Ruiz et M, Luquet. 2008. *Growth inhibition of methicillin- resistant Staphylococcus aureus by lactic acid bacterial strains*, Patent Application accepted in USA , Pub No 60 /876, 460
- Tauxe, R. V. 2002. *Emerging foodborne pathogens*. International journal of Food Microbiology 78, 31-41.
- Unal, S., J. Hoskins, J. E, Flokowitsch et al, 1992. *Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction*. Journal of Clinical Microbiology 30.
- Vanderhoof, J. A. 2001. *Probiotics: future directions*. American journal of Clinical Nutrition, 73(6 , supp.): S1
- Vasquez. A., G. Molin, B. Pettersson, M. Antonsson et S. Aherné. 2005. *DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of Lactobacillus casei/paracasei and related species*, Systematic and Applied Microbiology, 28, 430-441.
- Voss A., D. Milatovic, C. Wallrauch-Schwartz, T. Rosdahiv et L. Bravenyl. 1994, *methicillin- resistant Staphylococcus aureus in Europe*. Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 13: 50-55.
- Wallet, F., M. Roussel-Delvallez et R.J. Courcel. 1996. *Choice of a routine method for detecting methicillin-Resistance in Staphylococci* J.Antimicrobial Chemotherapy, 37, 901-909.
- Weman A. D. & Maddox, I. S. 2003. Exopolysaccharides from Lactic acid Bacteria perspectives and challenges. Trends in Biotechnology, 21(6), 269-274.
- Wen-Hsin Lin, Chin-Fa Hwang, Li-Wei Chen et Hau-Yang Tsen..2006. *Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products*, Food Microbiology vol. 23: 74-81.
- Wilkins, T. D. and S. Chalgren. 1976. *Medium for use in antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria*. Antimicrob . Agents Chemother. 10:926-928.

- Wilkins, T. D. and T. Thiel, 1973. *Modified broth-disk method for testin the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria* . Antimicrob . Agents Chemother . 3:350-356.
- Wilkinson, D. M. 1999. *Bacterial ecology antibiotics and selection for virulence*. *Ecology Letters*, 2: 207-9.
- Wilson M., 2008. *Bacteriology of Humans: an ecological prespective*. Blackwell Publishing. Oxford .
- Wilson M., 2005. *Microbial Inhabitant of Humans; their ecology and role in health and disease*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wilson M, J. Versalovic. 2008. *Probiotics and related strategies*. ASM Press.
- Witte,W., C. Cuny, B. Strommenger, C. Bräulke et D. HEUCK, 2004. *Emergence of community –acquired MRSA in Germany*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 13, 50-55 .
- Wood, B. J. B. et W. H. Holzapfel (éditeur) 1995 *The Lactic acid Bacteria* vol.2 *The genera of Lactic Acid Bacteria*, Blackie Academic & Professional London.
- Yamazumi T., I. Furuta, J. Diekema, M. A. Pfaller, et R. N. Jones, 2001, *Comparison of the Vitek Gram Positive Susceptibility 106 Card, the MRSA-Screen Latex Agglutination Test, and mec A Analysis for Detecting oxacillin Resistance in a Geographically Diverse Collection of Clinical Isolates of Coagulase – Negative Staphylococci*, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39 p 3633-3636.
- Shabnam, Y. 2002, *Characterisation of methicillin- resistant Staphylococcus aureus by phenotyping and genotyping method*, mémoire M.SC, Université de Montréal.
- Ziebuhr W., K.. Ohlsen, H. Karch et al. 1999. *Evolution of bacterial pathogenesis* .*Cellular and molecular life Sciences* , 56 : 719-28.